

**Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)**

**Untersuchungen der mutagenen Wirkung von Benzol
an Spermatogonien des Chinesischen Hamsters
(Cricetulus griseus)**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Peter Bertram

1979

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. RÖHRBORN)

Untersuchungen der mutagenen Wirkung von Benzol
an Spermatogonien des Chinesischen Hamsters
(*Cricetulus griseus*)

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Peter Bertram

1979

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr. Reinauer

Referent

gez.: Prof.Dr.Röhrborn

Korreferent

gez.: Prof.Dr.Schübel

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.





INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A	Einleitung
	3
I.	Problemstellung
	3
II.	Chemie und Pharmakologie der
	Testsubstanz Benzol
	9
B	Material und Methode
	15
I.	Versuchsaufbau und Bestimmung der
	max. tolerablen Dosis (MTD)
	15
II.	Entwicklung der männlichen Keim-
	zellen des Chinesischen Hamsters
	18
III.	Chromosomendarstellung durch
	Präparation der Hodentubuli
	21
1.	Technik der Präparation
	21
2.	Kriterien der Auswertung
	24
IV.	Der Chi-Quadrat-Vierfelder-Test
	29
C	Ergebnisse
	32
I.	Ergebnisse des Kontrollversuchs
	33
II.	Versuchsergebnisse mit Benzoldosis I
	34
III.	Versuchsergebnisse mit Benzoldosis II
	35
IV.	Versuchsergebnisse mit Benzoldosis III
	37
V.	Statistische Auswertung nach dem
	Chi-Quadrat-Test
	38
VI.	Vergleich zwischen Versuchs- und
	Kontrollergebnissen
	38
D	Diskussion
	41
E	Zusammenfassung
	49
F	Literaturverzeichnis
	50



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0102

A Einleitung

I. Problemstellung

Mutationen, also erbliche Veränderungen des genetischen Materials, sind der primäre Motor der Evolution.

In der Anfangsphase der Entwicklung des Lebens auf der Erde, als sich alle Funktionsproteine noch in einem Primitivzustand befanden, konnten Mutationen noch viel häufiger als heute positiv, also förderlich, eingreifen, denn bei der sehr geringen Differenzierung der Enzyme war die Chance, durch Aminosäureaustausch die Funktion zu verbessern, sehr viel größer als bei den heutigen, durch langes mutatives Probieren hochgezüchteten Enzymen.

Eine hohe Mutationsrate wird also bei primitiven Lebensformen durch Bildung relativ vieler, "positiver" Mutanten für eine schnelle Evolution sorgen, wohingegen sie sich bei hochentwickelten Organismen durch einen hohen Anteil "negativer" Mutanten eher nachteilig auswirkt.

Das Spektrum dieser Auswirkungen reicht beim Menschen von "Fertilitätsstörungen, embryonalem und perinatalem Tod über mehr oder weniger schwere Mißbildungen, Erbkrankheiten unterschiedlichsten Schweregrades bis zu genetisch bedingten Variationen im Bereich des Normalen. Die Übergänge von Letalmutationen zu Mutationen, die Erbkrankheiten verursachen, sind fließend. Darüber hinaus geht von den vielfältigen Krebserkrankungen wahrscheinlich ein Teil auf mutative Veränderungen von Körperzellen des Erkrankten zurück." (Auszug aus der Präambel der Mitteilung II der Kommission für Mutagenitätsfragen der Deutschen Forschungsgemeinschaft; Methoden zur Mutagenitätsprüfung 5, 1971).

Aus dieser Betrachtung wird die große Skepsis verständlich, mit der Genetiker und Mediziner heute alle mutationsauslösenden Umwelteinflüsse betrachten. Denn schon seit mehr als 50 Jahren ist die Tatsache bekannt, daß die sehr geringe natürliche Mutationsrate durch bestimmte Umwelteinflüsse erhöht wird. So beobachtete MULLER im Jahre 1927 einen starken Anstieg der Mutationsrate bei Drosophila nach Einwirkung von Röntgenstrahlen, und bald darauf konnte nachgewiesen werden, daß auch alle anderen ionisierenden Strahlen, sowie UV-Licht, mutagene Wirkung besitzen. Das Wissen um diese physikalischen Einflüsse ist besonders für diejenigen Menschen von Bedeutung, die einer Belastung durch künstliche Strahlungsquellen, wie z. B. in der medizinischen Diagnostik durch die Röntgenröhre, ausgesetzt sind.

Die Erforschung der chemischen Mutagenese setzte erst relativ spät ein, obwohl die toxischen Wirkungen der verschiedenen Stoffe, bedingt durch die klinischen Erscheinungsbilder, schon lange bekannt und untersucht waren. Erste Ergebnisse wurden 1944 von AUERBACH und ROBSON unter dem Titel "Productions of mutations by mustard oil allyl isothiocyanate" veröffentlicht.

Mit dem Aufschwung der chemischen und pharmazeutischen Industrie nach dem II. Weltkrieg wurde der Mensch mit einer Unzahl neuer Stoffe und Produkte konfrontiert, die auf ihre mutagene und teratogene Wirkung hin nur unvollkommen oder gar nicht untersucht worden waren. Die möglichen Auswirkungen eines solchen Versäumnisses wurden durch die Thalidomid-Katastrophe deutlich aufgezeigt. Es muß daher Aufgabe der Mutagenitätsforschung sein, möglichst alle Fremdstoffe mit geeigneten Testverfahren auf ihre Mutagenität hin zu untersuchen. Diese

Tests werden heute hauptsächlich an Mikroorganismen, *Drosophila melanogaster* und Säugetieren durchgeführt.

Bei der Beurteilung adäquater Testmethoden spielt besonders das Problem der Extrapolationen auf den Menschen eine große Rolle. So sind einerseits Ergebnisse, die an niederen Organismen gewonnen wurden, aufgrund der unterschiedlichen Stoffwechselbedingungen nicht auf den Menschen übertragbar, andererseits ist aber eine allgemeine in vivo Testung von chemischen Substanzen am Menschen aus ethischen und moralischen Gründen unmöglich. Daher ist man gezwungen, Organismen zu verwenden, deren Stoffwechsel dem des Menschen möglichst nahe kommt, bzw. deren pharmakokinetische und metabolische Unterschiede zum Menschen genau bekannt sind und so bei der Beurteilung von mutagenen Effekten (wie oben gefordert) in Betracht gezogen werden können. Aus diesen und auch aus technischen Gründen werden von Genetikern vor allem Kleinsäugetiere wie Mäuse, Ratten, Chinesische Hamster u. a. zur in vivo Testung herangezogen.

Neben der Auswahl der zu verwendenden Säugerspezies kommt dem Ansatz des Testverfahrens am Organismus eine große Bedeutung zu, da bekannt ist, daß verschiedene Gewebe und Keimzellstadien hinsichtlich einer mutagenen Wirkung mit unterschiedlicher Sensibilität gegenüber der Testsubstanz reagieren (VOGEL, RÖHRBORN, HANSMANN, 1974). Während jedoch voneinander abweichende Ergebnisse an den verschiedenen somatischen Geweben gegenüber dem betreffenden Mutagen auf echte Empfindlichkeitsunterschiede zurückgeführt werden können, ist die Spezifität der einzelnen Keimzellenstadien von komplexerer Natur. Hier können beispielsweise Chromosomenaberrationen in der Zeit zwischen ihrer Entstehung und ihrer Analyse in mitotischen

oder meiotischen Teilungen eliminiert werden.

Ein Beispiel dafür bieten die Befunde von ADLER (1973), SCHLEIERMACHER (1973) sowie GILLIAVOD und LEONARD (1971), die Spermatogonien von Mäusen mit Mitomycin C behandelten. ADLER und SCHLEIERMACHER unterzogen die Spermatogonien selbst einer zytogenetischen Analyse und stellten einen signifikanten Anstieg der Chromosomenaberrationsrate fest. GILLIAVOD und LEONARD (1971) warteten mit der Analyse bis zum Spermatozytenstadium (Metaphase I) und erhielten negative Resultate - sogar mit Standardmutagenen wie Methyl-methansulfat (MMS) u. a. Daraus schlossen sie: "The lack of chromosome rearrangements in the spermatocytes of mice after treatment with a chemical mutagen is not proof of the inefficiency of a compound to induce genetic changes in this species, and this technique cannot be used as a demonstrative test".

Dieser Bedeutung des Ansatzes eines zytogenetischen Testverfahrens soll auch in dieser Arbeit Rechnung getragen werden, deren Aufgabe es war, die Wirkung des Benzols auf die Spermatogonien des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) zu untersuchen, der wegen seines günstigen Karyotyps als Versuchstier am geeignetsten erschien (s. B II). Benzol wurde als Testsubstanz aufgrund seines weiten Anwendungsbereiches in den verschiedenen Industrien (s. A II) gewählt, in denen eine große Zahl der dort arbeitenden Personen einer Benzolexposition unterliegen. Auch trifft auf die Testsubstanz Benzol die oben getroffene Feststellung zu, daß ihre toxischen Wirkungen, die unter A II näher erläutert werden, lange bekannt und untersucht sind, wohingegen über mögliche mutagene Effekte wenig bekannt ist.

Verschiedene Autoren berichten über vermehrte strukturelle chromosomale Aberrationen in Lymphozytenkulturen und/oder Knochenmarkszellen bei chronisch Benzol-Exponierten, die an Benzolhämopathien erkrankt sind: FORNI und MOREO (1967) fanden numerische Chromosomenaberrationen in Knochenmarkspräparaten einer Patientin, bei der eine Benzolanämie nach einer langen Latenzperiode in eine akute Myeloblastenleukämie umgeschlagen war. KHAN und KHAN (1973) beschrieben u. a. einen Fall von Benzolmyelopathie, bei dem sowohl in Lymphozyten als auch in Knochenmarkszellen vermehrt strukturelle Chromosomenaberrationen registriert wurden.

POLLINI und COLOMBI (1964) analysierten Chromosomen von Knochenmarkszellen, die von einem Patienten gewonnen wurden, welcher an aplastischer Anämie nach Benzolexposition erkrankt war. 70 % der analysierten Metaphasen zeigten numerische Aberrationen und in einem Teil der Zellen wurden Chromatidenfragmente gefunden.

SELLYEI und KELEMEN (1971) berichteten über einen Patienten, bei dem sich nach 18monatiger Arbeit unter dem Einfluß von Luft-Benzolkonzentrationen zwischen 200 und 1640 mg/m³ eine Panzytopenie entwickelt hatte. 7 Jahre nach dem vermeintlichen Rückgang der Anämie traten die klinischen Symptome einer Leukämie auf. Die Analyse von 27 Metaphasen von Knochenmarkszellen ergab in allen Fällen numerische Aberrationen; 5 Metaphasen waren strukturell aberrant.

Zytogenetische Untersuchungen an chronischen Benzol-Exponierten, die noch keine hämatologischen Veränderungen aufwiesen, brachten sowohl positive (FORNI et al., 1971; HARTWICH und SCHWANITZ, 1972) als auch negative

Befunde (GÄTH und THIESS, 1972; TOUGH et al., 1970). Bei Untersuchungen an Knochenmarkspräparaten solcher Patienten fanden KHAN und KHAN (1973) bei drei Industriearbeitern eine erhöhte Aberrationsrate.

Diese bisher gewonnenen Ergebnisse, die zum Teil auf eine mögliche mutagene Wirkung des Benzols hindeuten, sind vor allem aus vier Gründen kritisch zu bewerten:

1. die Zahl der bisher untersuchten Fälle ist zu gering;
2. besonders Chromatidentypaberrationen zeigen beim Menschen eine relativ große interindividuelle Variabilität;
3. es ist bisher ungeklärt, ob chromosomale Veränderungen an Knochenmarkszellen eine Vorstufe von Leukosen sind, die ja durch Benzol hervorgerufen werden können, oder ob die Entstehung der Leukosen und der Chromosomenaberrationen unabhängig voneinander vor sich gehen;
4. die Befunde an somatischen Zellen können nicht ohne weiteres auf Keimzellen übertragen werden.

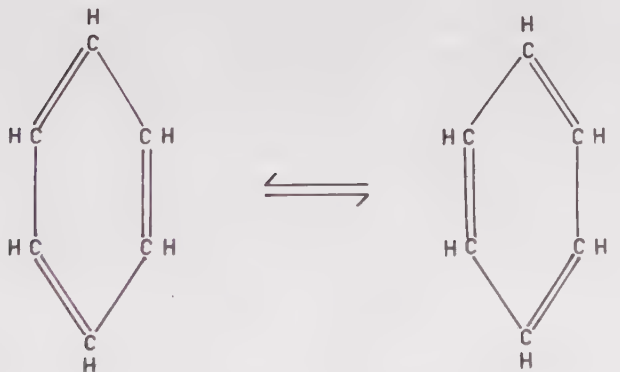
Besonders aus dem 4. Grund wurde daher die mutagene Wirkung von Benzol nach Einwirkung auf Spermatogonien geprüft. Um bei der Beurteilung der Ergebnisse eine Benefit-risk-Abschätzung zu ermöglichen, wurde die Wirkung von verschiedenen Benzoldosierungen getestet.

II. Chemie und Pharmakologie der Testsubstanz Benzol

Das Benzol, der Grundkörper der aromatischen Chemie, wurde von FARADAY im Jahre 1825 in einer durch Kompression von Ölgas gewonnenen Flüssigkeit entdeckt. Es findet sich in beträchtlichen Mengen im Steinkohlenteer, in dem es A. W. HOFMANN zuerst nachwies (1845) und aus welchem es heute technisch gewonnen wird.

Aufgrund des unterschiedlichen chemischen und physikalischen Verhaltens des Benzols gegenüber den aliphatischen Verbindungen beschrieb F. A. KEKULÉ 1865 die Strukturformel, den Benzolring:

Abb. 1: Strukturformel des Benzols (I)

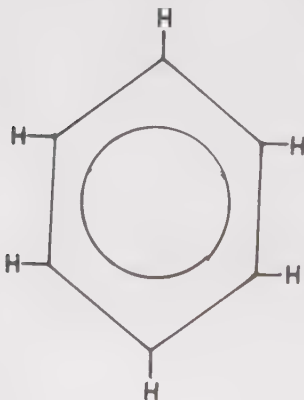


Mit dieser Schreibweise wird jedoch das Benzolmolekül nur unvollkommen wiedergegeben, denn wären die Formeln

(1) und (2) richtig, so müßten C-C-Bindungen von unterschiedlicher Länge gefunden werden, da die "C-C-Doppelbindung" um 0,21 Å kürzer ist, als die "C-C-Einfachbindung". In Wirklichkeit findet man aber sechs gleichwertige, 1,39 Å lange Bindungen. Man nimmt daher für das Benzol eine Struktur an, in der die sechs

Elektronen nicht mehr auf die π -Orbitale bestimmter Doppelbindungen lokalisiert sind, sondern sich über einen größeren Raum verteilen, der sich in Form von zwei ringförmigen Elektronenwolken über und unter der Molekülebene erstreckt. Um diese für den aromatischen Zustand typische Elektronenverteilung anzudeuten, wird häufig die Formel (2) angewandt, wobei der Kreis die sechs über das ganze Molekül verteilten Elektronen symbolisiert:

Abb. 2: Strukturformel des Benzols (II)



Das Benzol besitzt ein Molekulargewicht von 78,11, einen Schmelzpunkt von 5,5 °C und einen Siedepunkt von 80,2 °C. Neben der erwähnten Abtrennung aus dem

Steinkohlenteer wird das Benzol auch aus Kokereigasen und neuerdings aus Benzinfraktionen ("platforming process") in technischem Maßstab hergestellt.

Entsprechend seiner Bedeutung als Grundkörper der aromatischen Chemie findet das Benzol in weiten Bereichen der Industrie Verwendung, so z. B. als Ausgangsmaterial für die verschiedenen Benzolderivate (z. B. Anilin, Phenol, Nitrobenzol, viele Kunst- und Farbstoffe), als organisches Lösungsmittel (u. a. für Fette, Wachse, Öle, Lacke, Kautschuk, Kunststoffe und Klebstoffe) und als Zusatz im Motorenbenzin, um eine möglichst kloppffreie Verbrennung zu erreichen. Diesem Anwendungsbereich entsprechend sind viele Personen einer Benzoleinwirkung ausgesetzt.

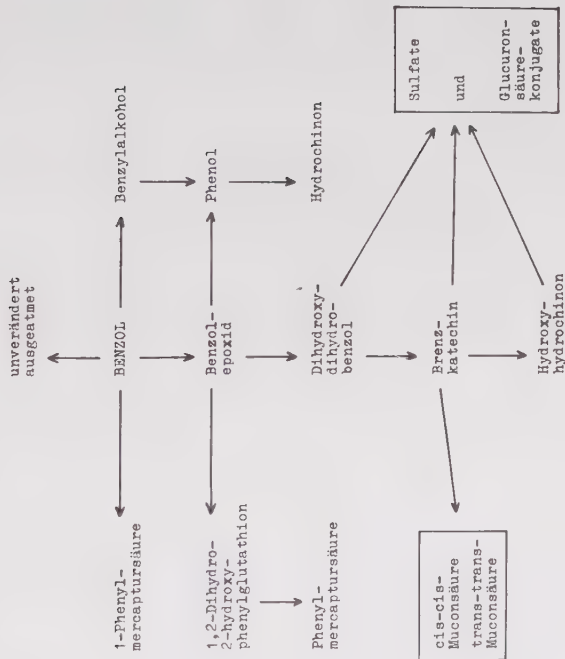
Die Aufnahme des Benzols in den Körper erfolgt in den meisten Fällen durch Inhalation, jedoch ist bei direktem Kontakt auch eine Resorption durch die Haut möglich (GERARDE, 1960). Im Blut wird Benzol infolge seiner hohen Lipoidlöslichkeit wahrscheinlich an Erythrozytenzellmembranen und Plasmalipoproteinen gebunden transportiert (DEAN, 1978). Nach oraler Applikation von (^{14}C) Benzol an Kaninchen stellten PARKE und WILLIAMS (1953) fest, daß 43 % unverändert wieder ausgeatmet wurden. 34 % erschienen im Urin u. a. als Konjugate von Phenol (23,5 %), Hydrochinon (4,8 %), Brenzkatechin (2,7 %), trans-trans-Muconsäure (1,3 %), 1-Phenyl-Mercaptursäure (0,5 %) und Hydroxy-Hydrochinon (0,3 %).

Im Körper wird Benzol besonders im Nerven- und Fettgewebe angereichert und übt so einen schädigenden Einfluß u. a. auf das Zentralnervensystem aus, der viele der unten aufgeführten toxischen Wirkungen bei akuter Benzolvergiftung erklärt. GONASUN et al. (1973) stellten

die Bedeutung der Leberoxidasen für den Benzol-metabolismus heraus und folgerten aus ihren Versuchsergebnissen an Mäuseleber-Mikrosomen, daß die Stoffwechselrate des Benzols besonders durch seine Bindung an Cytochrom P 450 beeinflußt wird.

Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Stoffwechselwege des Benzols in Säugetieren.

Abb. 3: "Wahrscheinliche Wege der biologischen
Umwandlung des Benzols in Säugetieren"
(nach DEAN, 1978)



Bei der toxischen Wirkung des Benzols ist eine akute von einer chronischen Vergiftung zu unterscheiden. Die akute Benzolvergiftung, die nur bei relativ hohen Konzentrationen eintritt, äußert sich in der leichten Form in Schwindel, Benommenheit, Kopfschmerzen und Brechreiz. Hinzu kommt eine euphorische Komponente, die in einer Art Trunkenheitsgefühl mit rauschähnlichen Bildern besteht, was einmal zur Folge hat, daß die Einsicht in die Gefahr herabgesetzt wird und zum anderen bei disponierten Personen zu einer regelrechten Benzolsucht führen kann. Bei schweren akuten Vergiftungen durch Einwirkung von sehr hohen Konzentrationen (Blutbenzolgehalt 0,1 - 2 mg%) kommt es zu Schweißausbrüchen, Krämpfen, Lähmungen und zum Tod durch Kreislaufversagen.

Eine chronische Vergiftung durch geringe Benzolmengen führt zu Schädigungen des Knochenmarks, die die verschiedenen Blutbildungssysteme (Erythropoese, Granulopoese, Thrombopoese) isoliert, kombiniert oder in ihrer Gesamtheit im Sinne einer Panmyelopathie erfassen können, wobei sowohl Unterfunktionen als auch Überfunktionen mit krebssiger Entartung beobachtet werden können.

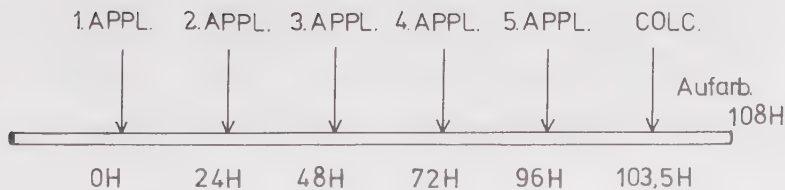
HENSCHLER (1974) führte in seiner Zusammenstellung von Mitteilungen über "Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe" eine Reihe von hämatologischen Befunden an, die an Personen mit langfristiger Benzolexposition erhoben wurden. Diese reichen von Anämien, Leukopenien, Thrombopenien und Panzytopenien bis zu verschiedenen Formen von leukämischen Erkrankungen. Als vermutliche Ursache für die knochenmarkstoxischen Wirkungen gibt HENSCHLER (1974) das hochreaktive Benzolepoxid an. Eine knochenmarksschädigende Wirkung der anderen Metabolite wie Phenol und Dihydroxybenzole konnte nicht nachgewiesen werden.

B Material und Methode

I. Versuchsaufbau und Bestimmung der maximal tol. Dosis (MTD)

Als Versuchstiere dienten 10 - 15 Wochen alte Chinesische Hamster (*cricetulus griseus*), deren Gewicht zwischen 29 und 38 g lag, aus der Zucht (Stamm CH1) des Institutes für Anthropologie und Humangenetik der Universität Heidelberg. Innerhalb einer Versuchsreihe wurde den Tieren fünfmal im zeitlichen Abstand von je 24 Stunden Benzol durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Aufbereitung der Tiere erfolgte 12 Stunden nach der letzten Applikation. Viereinhalb Stunden vor der Aufbereitung wurde den Tieren 0,1 mg Colcemide (Ciba) pro 10 g Körpergewicht i. p. injiziert.

Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs



Um eine mögliche Dosisabhängigkeit der Benzolwirkung zu erfassen, wurde die Substanz in drei unterschiedlichen Dosierungen getestet, wobei als Höchstdosis die maximal tolerable Dosis (MTD) appliziert werden sollte. Die übrigen Dosierungen sollten die Hälfte bzw. ein Viertel der MTD betragen. Die intraperitoneale Applikation wurde gewählt, weil sie sich schon in vorigen Versuchen als besonders sensibel erwiesen hatte (RÖHRBORN, persönliche Mitteilung).

Die Toxizität bei parenteraler Verabfolgung von Benzol ist erst in sehr wenigen Untersuchungen geprüft worden.

So beobachtete WINSLOW (1927) bei der i. p.-Applikation von 1,0 mg Benzol pro kg Körpergewicht an Ratten Wirkungen auf das ZNS mit manchmal vollkommener Lähmung aber späterer Erholung. Eine i. p.-Injektion von 2,0 mg Benzol pro kg Körpergewicht an Ratten gab er als "tödliche Dosis" an.

Zur Gewinnung einer genauen Angabe über die MTD wurden in einem Vorversuch Chinesische Hamster mit Benzoldosierungen von 4,0 ml, 2,0 ml, 1,0 ml, 0,5 ml und 0,25 ml pro kg Körpergewicht behandelt. Die Applikation von 4 ml Benzol/kg Körpergewicht und 2 ml Benzol/kg Körpergewicht führte in allen Fällen schon vorzeitig zum Exitus letalis. Die fünfmalige Injektion von 1 ml Benzol/kg Körpergewicht wurde von 50 % der Versuchstiere, die Dosierungen von 0,5 ml Benzol/kg Körpergewicht und 0,25 ml Benzol/kg Körpergewicht von 100 % der Versuchstiere toleriert.

Tabelle 1: Versuchsergebnisse zur Bestimmung der MTD

Dosis (ml Benzol/kg KG)	Behandelte Tiere	Überlebende Tiere	abgestorbene Tiere nach der				
			1.Appl.	2.Appl.	3.Appl.	4.Appl.	5.Appl.
4,0	12	-	11	1	-	-	-
2,0	6	-	1	4	1	-	-
1,0	6	3	0	1	0	1	1
0,5	3	3	0	0	0	0	0
0,25	3	3	0	0	0	0	0

Aufgrund dieser Ergebnisse ergaben sich für den Versuch folgende drei Dosierungen:

- I) 5 x 1,0 ml Benzol pro kg Körpergewicht im
24 Stunden-Intervall
- II) 5 x 0,5 ml Benzol pro kg Körpergewicht im
24 Stunden-Intervall
- III) 5 x 0,25 ml Benzol pro kg Körpergewicht im
24 Stunden-Intervall

Pro Dosis wurden 5 behandelte Hamstermännchen untersucht. Vor jeder Applikation wurden die Tiere gewogen und nach dem Gewicht die zu injizierende Menge reinen Benzols der Firma Merck, Art. 1783 errechnet. Die Injektionen wurden mit Mikroliterspritzen der Größen 50 µl und 10 µl vorgenommen.

Als Kontrolltiere dienten 5 unbehandelte Hamstermännchen.

II. Entwicklung der männlichen Keimzellen des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*)

Die Entwicklung der männlichen Keimzellen verläuft bei allen Nagetieren in ähnlicher Form und umfaßt mehrere Stadien. In der Praespermatogenese des fetalen Hodens erfolgt die Proliferation der Sertoli-Zellen, die sich zu einem stützenden und ernährenden Grundgewebe entwickeln. Die Keimstränge bilden sich zu primitiven Samenkanälchen (tubuli seminiferi contorti) um, und durch mitotische Teilungen entstehen aus den primordialen Keimzellen die Stammzellenpermatogonien (A_S -Spermatogonien).

Mit vier aufeinanderfolgenden mitotischen Teilungen der Stammzellen zu den Spermatogoniengenerationen 1 - 4 (A_{1-4} -Spermatogonien) beginnt die Spermatogenese. Obwohl unterschiedliche Auffassungen über die Herkunft der A_1 -Zellen bestehen, sprechen neuere Untersuchungen von OAKBERG (1971) für die Entwicklung aus den A_S -Spermatogonien. Die $A_1 - 4$ -Spermatogonien stellen sich im Mikroskop als große, einfache Zellen mit ovalem Kern und staubartig granuliertem Chromatin dar. weshalb sie auch häufig Staubspermatogonien genannt werden. Aus der 4. A-Spermatogoniengeneration entstehen nach weiterer Mitose die Intermediärspermatogonien (In-Spermatogonien), die sich wiederum mitotisch zu den B-Spermatogonien entwickeln (LEBLOND und CLERMONT, 1952). Die B-Spermatogonien sind die kleinsten auftretenden Spermatogonien; sie besitzen einen dunklen Kern mit grober Chromatinmasse, weshalb sie auch Krustenspermatogonien genannt werden. Die Intermediärspermatogonien nehmen größtmäßig eine Mittelstellung zwischen A- und B-Spermatogonien ein.

Die Entwicklung der B-Spermatogonien zu den Spermatozyten I. Ordnung stellt die letzte mitotische Teilungsphase der Spermatogenese dar. Nach einem Ruhestadium treten diese Spermatozyten I. Ordnung in eine erste meiotische Teilung ein, in der die Reduktion des diploiden Chromosomensatzes ($2n = 22$) auf den haploiden Chromosomensatz ($1n = 11$) der Spermatozyten II. Ordnung erfolgt. Diese teilen sich nach einer erneuten Interkinese in die haploiden Spermatiden (Äquationsteilung), welche sich in der nun folgenden Spermiogenese durch morphologische Umgestaltung zu den befruchtungsfähigen Spermien entwickeln.

Die Stadien der Spermatogenese und Spermiogenese werden im Parenchym der tubuli seminiferi cotorti durchlaufen, wobei mit fortschreitender Reifung und Differenzierung die einzelnen Zellen von basal in weiter zentral gelegene Schichten des tubulus contortus rücken. Der zeitlichen Folge der Spermiogenese entspricht also eine räumliche von außen nach innen.

In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit wurde auf eine Differenzierung der Spermatogonien in A-, In- und B-Spermatogonien verzichtet.

Tabelle 2: Übersicht über die Entwicklung der männlichen Keimzellen des Chinesischen Hamsters

<u>PRAESPERMATOGENESE:</u>	Primordiale Keimzellen (Gonozyten)	
	A _S -Spermatogonien	Mitose
		Mitose
<u>SPERMATOGENESE:</u>	A ₁₋₄ -Spermatogonien	Mitose
	In-Spermatogonien	Mitose
	B-Spermatogonien	Mitose
	Spermatozyten I. Ordnung (2n = 22)	
		<u>Meiose</u> (Redukt.- tlg.)
	Spermatozyten II. Ordnung (1n = 11)	
		Meiose (Äquat.- tlg.)
<u>SPERMIOGENESE:</u>	Spermatiden	
		Metamor- phose
	Spermien	

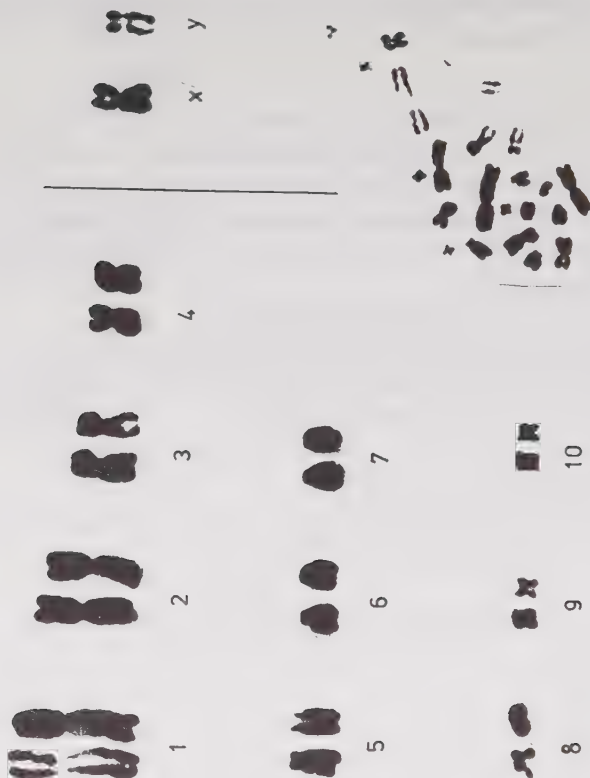
III. Chromosomendarstellung durch Präparation der Hodentubuli

Wie schon in der Einleitung angedeutet, bietet die Analyse mitotischer Metaphasechromosomen von Spermatogonien gegenüber der Untersuchung meiotischer Chromosomen (WELSHONS, GIBSON, SCANDLYN, 1962; EVANS, BRECKON, FORD, 1964; SCHLEIERMACHER, 1966) einige bedeutende Vorteile:

1. Nahezu alle morphologischen Aberrationen sind erkennbar; sogar geschädigte Stammzellspermatogonien können mit untersucht werden;
2. die Präparationsmethode ist technisch einfach durchzuführen;
3. strukturelle Aberrationen sind gut analysierbar und interpretierbar.

Der scheinbare Nachteil, daß in Metaphasechromosomen nachgewiesene Mutationen während der Meiose eliminiert werden können, ist für die praktische Beurteilung einer mutagenen Substanz ohne Bedeutung, da mit Sicherheit nicht alle induzierten Chromosomenaberrationen in der Meiose eliminiert werden (VOGEL, RÖHRBORN, HANSMANN, 1974). Der Vorteil der leichten Analyse wird durch den günstigen Karyotyp (Abb. 4) des hier eingesetzten Versuchstieres unterstützt, der sich durch eine niedrige Chromosomenzahl ($2n = 22$) und eine relativ einfache morphologische Differenzierbarkeit der einzelnen Chromosomen (FORD und YERGANIAN, 1958) auszeichnet.

Abb. 5: Karyotyp des Chinesischen Hamsters ($2n = 22$)



1. Technik der Präparation

Viereinhalb Stunden vor der Aufarbeitung wurde den Versuchstieren 0,1 mg Colcemide (Ciba) pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zur Aufarbeitung der Hodentubuli und Präparation der Spermatogonien wurde die von SCHLEIERMACHER (1967) beschriebenen Methode modifiziert:

1. Die Versuchstiere werden durch Äther getötet.
2. Ein Hoden wird sorgfältig herauspräpariert und auf ein Uhrglas gebracht, das auf 37 °C vorgewärmt wurde.

3. Die Tunica albuginea wird vorsichtig entfernt und die Tubuli mit einer Schere sorgfältig zerkleinert.
4. Zu den zerhackten Tubuli wird 1 ml einer 37 °C warmen 0,8 %igen Natriumcitrat-Lösung gegeben.
5. Die Tubuli werden in ein ebenfalls vorgewärmtes Zentrifugenröhrchen gebracht und 9 ml der vorgewärmten 0,8 %igen Natriumcitrat-Lösung zugegeben. Anschließend wird die Suspension vorsichtig aufpipettiert.
6. Man läßt die Suspension 4 Minuten sedimentieren.
7. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und das zurückbleibende Sediment in 10 ml frischer hypotoner (0,8 %) Lösung resuspendiert. Die gesamte hypotone Behandlung soll nicht länger als 8 Minuten dauern.
8. Die Suspension wird für 30 Sekunden bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Sediment enthält nun vorwiegend Tubulifragmente.
9. Tropfenweise werden 10 ml Äthanol/Eisessig (3 : 1) als Fixativ zugegeben; die Suspension wird wiederum vorsichtig durchpipettiert.
10. Die Röhrchen werden mit Parafilm abgedeckt und 2 Stunden in den Kühlschrank gestellt.
11. Die Fixierlösung wird dekantiert und der Fixiervorgang mit frischem Fixativ wiederholt. Anschließend werden die Röhrchen über Nacht in den Kühlschrank gestellt.
12. Am nächsten Morgen wird die Suspension 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und danach der Überstand dekantiert.
13. Es erfolgt ein nochmaliges Fixieren mit wenig Fixativ. Die Tubuli werden durch Beklopfen des Röhrchens nach oben gewirbelt.
14. Die am Boden verbliebene Zellsuspension wird auf kalte und nasse Objektträger aufgetropft.

15. Die Präparate werden luftgetrocknet.
16. Die Präparate werden für 3 Minuten in Methanol gestellt, danach 15 Minuten in 5 %iger Giemsalösung gefärbt und in Aqua dest. gespült.
17. Die Objektträger werden nochmals luftgetrocknet und mit Eukitt eingedeckelt.

2.) Kriterien der Auswertung

Die Auswertung der vorher durch einen Mitarbeiter des Institutes codierten Präparate wurde bei 1000facher Vergrößerung (Objektiv: Planapochromat 100x; Okular: 10x) durchgeführt. Pro Tier wurden 100 Metaphasen nach folgenden Kriterien ausgewertet:

A) Numerische Aberrationen

Aneuploide Metaphasen mit mehr als 22 ± 2 Chromosomen ebenso polyploide Metaphasen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Da Zellsuspensionsmethoden Verluste oder Austausch von einzelnen Chromosomen ermöglichen, ist hier kein relevantes Ergebnis hinsichtlich numerischer Aberrationen zu erzielen.

B) Strukturelle Aberrationen (Abb. 5)

1. Lokale Achromasien = Gaps

- a) Chromatidengap G'
- b) Isochromatidengap G''

Def.: Gaps sind färberische Lücken in Chromosomen bzw. Chromatiden, die optisch zu einem Substanzverlust führen, ohne einen Verlust der Kontinuität der Chromatinstruktur zu beinhalten (n. GEBHARDT, 1974).

2. Brüche

- a) Chromatidenbruch B'
- b) Chromosomenbruch B''

Def.: Eine Diskontinuität der Chromatide bzw. des Chromosoms mit achsen-gerechter oder achsenverschobener Dislokalisierung des Bruchstückes. Der Zusammenhang mit einem Exchangeprozeß darf nicht gegeben sein (n. SAVAGE, 1975).

3. Deletionen

- a) Chromatidendeletion D'
- b) Chromosomendeletion D''

Def.: Substanzverlust auf Chromosomen- oder Chromatidenebene.

4. Fragmente

- a) Chromatidenfragmente F'
- b) Chromosomenfragmente F''

Def.: Azentrische Chromatiden- oder Chromosomensegmente.

5. Exchange - Figuren

- a) Intrachange

Def.: Veränderung innerhalb eines Chromosoms (z. B. Ringchromosom)

- b) Interchange

Def.: Veränderung zwischen zwei oder mehreren Chromosomen auf Chromatidenebene (I');
Veränderung zwischen zwei oder mehreren Chromosomen auf Chromosomenebene (I'').

6. Multiple Aberrationen

Def.: Eine Metaphase enthält mehr als fünf Aberrationen.

7. Pulverisationen und Fragmentationen

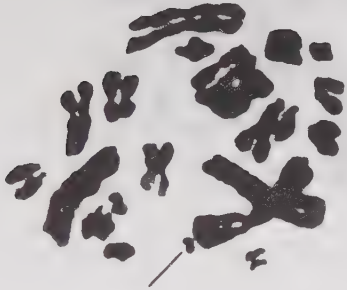
Def.: Die Chromosomen sind zerstückelt, das Chromatin liegt in pulverisierter Form vor, typische Chromatiden- und Chromosomenstrukturen sind aufgehoben; es besteht ein fließender Übergang zwischen multiplen Aberrationen, Fragmentationen und Pulverisationen.

Besonderheit der Auswertung:

Beim X-Chromosom des Chinesischen Hamsters findet man am distalen Ende des langen Armes nicht selten eine sekundäre Konstriktion, die in den meisten Fällen beide Chromatiden betrifft, sodaß der Eindruck hervorgerufen wird, es handele sich um einen Isogap. Eine Wertung als Gap wurde nur dann vorgenommen, wenn das X-Chromosom gleich groß bzw. kleiner als das 3. und 4. Chromosomenpaar war und die sekundäre Konstriktion nur eine Chromatide betraf (RÖHRBORN, pers. Mitteilung).

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde der χ^2 (Chi-Quadrat)-Test herangezogen, der im folgenden Abschnitt kurz beschrieben wird.

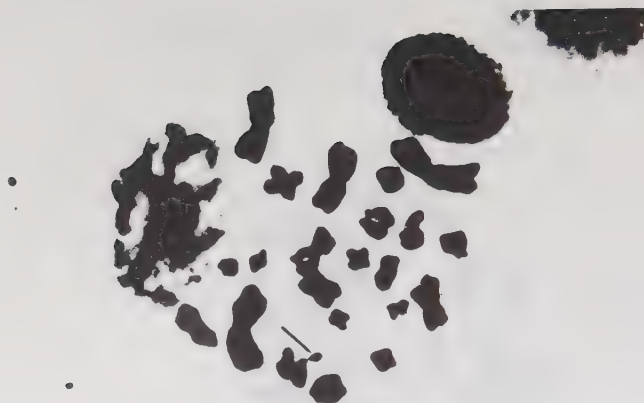
Abb. 6: Beispiele für gefundene Aberrationen



6.1: 21, F''



6.2: 22, F', G'



6.3: 22, B'



6.4: 22, G'

IV. Der χ^2 (Chi-Quadrat)-Vierfelder-Test

Besonders in der Medizin und den Naturwissenschaften ist der Vergleich zweier aus Häufigkeiten ermittelter relativer Häufigkeiten wichtig. So stellt sich auch in dieser Arbeit das Problem statistisch wie folgt:

In einer unbehandelten Gruppe von Kontrolltieren finden sich n_K aberrante Methaphasen; in drei mit verschiedenen Benzoldosierungen behandelten Versuchstiergruppen finden sich n_1 , n_2 und n_3 aberrante Metaphasen. Liegt in den einzelnen Dosisgruppen ein signifikanter Anstieg aberranter Metaphasen gegenüber der Kontrollgruppe vor, oder sind die Häufigkeitsunterschiede unerheblich, sodaß die Beurteilung hinsichtlich der mutagenen Wirkung der Testsubstanz negativ ausfallen muß?

Eine Klassifizierung von einer Dosisgruppe und einer Kontrollgruppe nach je zwei Merkmalspaaren (behandelte/ nicht behandelte Hamster, aberrante/ nicht aberrante Metaphasen) führt zu 4 Häufigkeiten a, b, c, d, und damit zu einer sogenannten Vierfeldertafel, die in Tabelle 3 für die vorliegende Problemstellung aufgestellt ist:

Tabelle 3:

Merkmalpaar I	Merkmalpaar II	aberrante Metaphasen (incl. Gaps)	nicht ab- errante Me- taphasen	insgesamt
1. Gruppe (behandelte Tiere)		a	b	$a + b = n_1$ (2, 3)
2. Gruppe (nicht be- handelte Kontroll- tiere)		c	d	$c + d = n_K$
insgesamt		$a + c$	$b + d$	$n_1 + n_K = n$

Es werden nun die Häufigkeiten auf Proportionalität ge-
prüft, d. h. ob sowohl die Verhältnisse a/c und b/d
nur Zufallsabweichungen (= nicht signifikant) von dem
durchschnittlichen Verhältnis $(a + b)/(c + d) = n_1/n_K$
sind, als auch die Verhältnisse a/b und c/d als zufäl-
lige (= nicht signifikante) Abweichungen von dem durch-
schnittlichen Verhältnis $(a + c)/(b + d)$ angesehen wer-
den können. Es werden somit die Grundwahrscheinlichkei-
ten von Binominalverteilungen verglichen, d. h. anhand
des χ^2 -Testes mit folgender Formel geprüft:

$$\chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a + b) (c + d) (a + c) (b + d)}$$

mit $n = a + b + c + d$

Da bei gegebenen Randsummen (s. Tab. 3) nur eine der 4 Häufigkeiten frei gewählt werden kann, besitzt das Vierfelder- X^2 nur einen Freiheitsgrad, d. h. bei errechnetem X^2 -Wert wird der entsprechende P-Wert (Wahrscheinlichkeitswert) in der X^2 -Tafel für einen Freiheitsgrad nachgeschlagen.

Als signifikant wurden P-Werte kleiner als 0,01 angesehen, was X^2 -Werten größer als 6,63 (bei zweiseitigem Test) entspricht.

C Ergebnisse

Insgesamt wurden 30 Tiere mit Benzol behandelt; hinzu kamen 5 unbehandelte Hamstermännchen als Kontrolltiere. Da bei der Benzoldosis I (1,0 ml/kg KG) noch mit einem 50 %igen Absterben der Tiere zu rechnen war (s. Tabelle 1), wurden hier 15 Tiere angesetzt, von denen 6 die fünfmalige Benzolapplikation überlebten. Mit Benzoldosis II (0,5 ml/kg KG) wurden 8 Tiere behandelt, von denen 7 die fünfmalige Applikation überlebten. Die fünfmalige Behandlung mit 0,25 ml Benzol/kg KG (Dosis III) überlebten alle der 7 angesetzten Tiere.

Aus Tabelle 4 ist der Zeitpunkt des Absterbens der Versuchstiere in Abhängigkeit von der applizierten Benzoldosis ersichtlich:

Tabelle 4:

Dosis (ml Benzol/kg KG)	behandelte Tiere	überlebende Tiere n %	abgestorbene Tiere nach der				
			1.Appl.	2.Appl.	3.Appl.	4.Appl.	5.Appl.
1	15	6 40	0	0	3	3	2
0,5	8	7 87,5	0	0	0	0	1
0,25	7	7 100	0	0	0	0	0

I. Ergebnisse des Kontrollversuchs

Von den fünf Kontrolltieren wurden pro Tier 100 Metaphasen untersucht. Inklusive Gaps fanden sich insgesamt 11 aberrante Metaphasen (2,2 %) und exklusive Gaps 2 aberrante Metaphasen (0,4 %).

Tabelle 5 gibt einen Überblick über das Gesamtergebnis des Kontrollversuchs.

Tabelle 5: Ergebnisse des Kontrollversuchs

ausgewertete Metaphasen	aberrante Metaphasen inklusive Gaps		aberrante Metaphasen exklusive Gaps	
	n	%	n	%
500	11	2,2	2	0,4

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse bei jedem einzelnen Kontrolltier. Es ist ersichtlich, daß außer einer Metaphase bei Tier 2, die einen Bruch und ein Fragment enthielt und einer Metaphase bei Tier 3, die einen Bruch aufwies, keine weiteren strukturellen Aberrationen gefunden wurden.

Tabelle 6: Ergebnisse bei den einzelnen Kontrolltieren

Tier Nr.	ausgewertete Metaphasen	aberrante Metaphasen inkl. Gaps	aberrante Metaphasen exkl. Gaps	Brüche	Fragmente
1	100	2	0	0	0
2	100	3	1	1	1
3	100	2	1	1	0
4	100	3	0	0	0
5	100	1	0	0	0
ge- samt	500	11	2	2	1

II. Versuchsergebnisse mit Benzoldosis I

(1 ml Benzol/kg KG)

In den ausgewerteten 500 Metaphasen fanden sich inklusive Gaps 17 aberrante Metaphasen (3,4 %) und exklusive Gaps 6 aberrante Metaphasen (1,2 %).

Tabelle 7: Gesamtergebnis des Versuchs mit Benzoldosis I

untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inklusive Gaps		aberrante Metaphasen exklusive Gaps	
	n	%	n	%
500	17	3,4	6	1,2

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse von jedem einzelnen Versuchstier aufgeführt, die zeigen, daß an strukturellen Aberrationen 1 Bruch und 5 Fragmente auftraten. Deletionen, Intra- und Interchanges wurden ebensowenig gefunden wie multiple Aberrationen und Pulverisationen.

Tabelle 8: Ergebnisse der mit der Benzoldosis I behandelten Versuchstiere

Tier Nr.	untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inkl. Gaps	aberrante Metaphasen exkl. Gaps	Brüche	Fragmente
1	100	3	1	0	1
2	100	3	2	1	1
3	100	4	1	0	1
4	100	4	1	0	1
5	100	3	1	0	1
ge- samt	500	17	6	1	5

III. Versuchsergebnisse mit Benzoldosis II (0,5 mg/kg KG)

Hier fanden sich in den untersuchten 500 Metaphasen inklusive Gaps 10 aberrante (2,0 %) und exklusive Gaps 4 aberrante Metaphasen (0,8 %).

Tabelle 9 gibt einen Überblick über das Gesamtergebnis mit Benzoldosis II.

Tabelle 9: Gesamtergebnis mit Benzoldosis II

Untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inklusive Gaps		aberrante Metaphasen exklusive Gaps	
	n	%	n	%
500	10	2,0	4	0,8

In der folgenden Aufschlüsselung des Ergebnisses (Tabelle 10) zeigt sich, daß auch bei Benzoldosis II nur 1 Bruch und 3 Fragmente als strukturelle Aberrationen auftraten.

Tabelle 10: Ergebnisse der mit der Benzoldosis II behandelten Tiere

Tier Nr.	untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inkl. Gaps	aberrante Metaphasen exkl. Gaps	Brüche	Fragmente
6	100	3	3	1	1
7	100	2	0	0	0
8	100	1	0	0	0
9	100	2	1	0	1
10	100	2	1	0	1
ge- samt	500	10	4	1	3

IV. Versuchsergebnisse mit Benzoldosis III
(0,25 ml/kg KG)

Von den untersuchten Metaphasen waren inklusive Gaps
12 aberrant (2,4 %) und exklusive Gaps 1 aberrant
(0,2 %).

Tabelle 11: Gesamtergebnis mit Benzoldosis III

Untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inklusive Gaps		aberrante Metaphasen exklusive Gaps	
	n	%	n	%
500	12	2,4	1	0,2

Bei Benzoldosis III wurde als strukturelle Aberration
lediglich 1 Fragment gefunden, wie Tabelle 12 aufzeigt:

Tabelle 12: Ergebnisse der mit der Benzoldosis III
behandelten Tiere

Tier Nr.	untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen inkl. Gaps	aberrante Metaphasen exkl. Gaps	Brüche	Fragmente
11	100	2	0	0	0
12	100	2	1	0	1
13	100	3	0	0	0
14	100	3	0	0	0
15	100	2	0	0	0
ge- samt	500	12	1	0	1

V. Statistische Auswertung nach dem χ^2 -Test

Tabelle 13 gibt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Versuche wieder. Als signifikante Abweichung von den Kontrollwerten wurden P-Werte kleiner als 0,01 angesehen, was χ^2 -Werten größer als 6,63 (bei zweiseitigem Test) entspricht.

Tabelle 13: Statistische Auswertung der Versuche

Benzoldosis	P-Wert	χ^2 -Wert
1 ml/kg KG	0,25	1,32
0,5 ml/kg KG	0,8	0,04
0,25 ml/kg KG	0,8	0,04

Es zeigt sich, daß bei allen drei Benzoldosierungen keine statistisch signifikante Erhöhung der Aberrationen gegenüber den Kontrollwerten vorliegt.

VI. Vergleich zwischen Versuchs- und Kontroll- ergebnissen

Die höchste Rate strukturell aberranter Metaphasen sowohl inklusive als auch exklusive Gaps trat mit 3,4 % bzw. 1,2 % bei einer Dosis von 1 ml Benzol/kg KG und 24 Stunden auf. Die Kontrollraten betrugen 2,2 % (in-

klusive Gaps) und 0,4 % (exklusive Gaps). Die Letalitätsquoten in Tabelle 3 zeigen, daß hier eine massive Benzolintoxikation vorgelegen haben muß. Dennoch sind, wie die statistische Auswertung zeigte, die Erhöhungen gegenüber der Kontrolle als nicht signifikant anzusehen.

In Tabelle 14 sind die einzelnen Versuchsergebnisse den Kontrollergebnissen gegenübergestellt.

Tabelle 14: Gesamtergebnisse der Versuche und der Kontrolle (%)

Dosis (ml Benzol/ kg KG)	Metaphasen n	aberrante Metaphasen inkl. Gaps (%)	aberrante Metaphasen exkl. Gaps (%)
1	500	3,4	1,2
0,5	500	2,0	0,8
0,25	500	2,4	0,2
Kontrolle	500	2,2	0,4

Als häufigster Aberrationstyp wurden in allen untersuchten Gruppen Gaps gefunden. Aber sowohl hier, wie auch beim Vergleich der anderen Aberrationstypen, ließen sich gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede finden, wie Tabelle 15 zeigt.

Tabelle 15: Gesamtergebnisse der Versuche und der Kontrolle (numerisch)

Dosis (ml Benzol/ kg KG)	Metaphasen n	Gaps n	Brüche n	Fragmente n
1	500	14	1	5
0,5	500	6	1	3
0,25	500	11	0	1
Kontrolle	500	11	2	1

In dieser Tabelle wurden alle in den aberranten Metaphasen gefundenen Gaps aufgeführt.

Die schwersten Aberrationen, die gefunden wurden, waren Fragmente, d. h. Folgen nicht verheilter Brüche. Auffallend ist, daß die Zahl der Fragmente mit der Dosis anstieg. Die Signifikanzschränke wurde jedoch auch hier nicht erreicht.

D Diskussion

Die Erfahrung, daß die chronische Einwirkung kleiner und kleinster Benzolmengen die verschiedensten Schädigungen des Knochenmarkes zur Folge haben kann, führte zu einer Reihe von Tierexperimenten, die einen genaueren Aufschluß über die pathogene Wirkung des Benzols geben sollten. In diesen Versuchen zeigten sich zwar Schädigungen an parenchymatösen Organen und Blutbildveränderungen, eine eindeutige leukämogene Wirkung konnte jedoch selbst nach langdauernder Benzolinhalation nicht nachgewiesen werden (BOJE et al., 1970; HOUGH und FREEMAN, 1944; NAU et al., 1966; SVIRBELY et al., 1944; WINSLOW, 1927; YANT et al., 1936).

In einer Dokumentation des NATIONAL RESEARCH COUNCIL ADVISORY CENTRE ON TOXIKOLOGY (1976) wird festgestellt, daß auch beim Menschen die leukämogene Wirkung des Benzols nicht eindeutig ist, da in allen bisher berichteten Fällen die benzolexponierten Individuen zusätzlich dem Einfluß anderer chemischer Agentien in hoher Konzentration ausgesetzt waren. Im NRC-Bericht (1976) wird daher angenommen, daß eine Benzol-Leukämie nur bei genetisch disponierten Individuen auftritt oder wenn Benzol in Verbindung mit anderen Einflüssen chemischer, physikalischer oder viraler Art einwirkt. Da ein Zusammentreffen dieser einzelnen Faktoren bei Industriearbeitern nicht auszuschließen ist, werden die chronische Myelose und die Erythromyelose nach Benzolexposition als Berufsschäden anerkannt.

Den zahlreichen toxikologischen Untersuchungen stehen nur wenige in vivo zytogenetische Tierexperimente gegenüber, in denen die mutagene Wirkung des Benzols geprüft

wurde. RUPPERT (1977) untersuchte Benzol auf seine mutagene Wirkung am Knochenmark des Chinesischen Hamsters. Den Tieren wurde fünfmal im Abstand von 24 Stunden Benzol intraperitoneal injiziert. Es wurden drei Dosierungen getestet: 0,25 ml/kg KG; 0,5 ml/kg KG und 1 ml/kg KG. 12 Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere getötet und das Knochenmark nach der Chromosomenanalyse und dem Mikrokerntest untersucht. Mit beiden Untersuchungsmethoden zeigte sich bei keiner der drei Dosierungen eine signifikant erhöhte Aberrationsrate.

KISSLING und SPECK (1971) applizierten Kaninchen durchschnittlich 18 Wochen lang täglich 0,2 ml Benzol/kg KG durch subcutane Injektion. Sie analysierten das Knochenmark, nachdem die Leukozytenzahl der Tiere unter 1000/mm³ abgesunken war und fanden eine erhöhte Aberrationsrate.

PHILIP und JENSEN (1970) injizierten Ratten an 2 bzw. 3 aufeinanderfolgenden Tagen 2 ml Benzol/kg KG subcutan und untersuchten die Tiere 24 Stunden nach der letzten Applikation nach dem Knochenmarkverfahren. Andere Tiere wurden 12 bzw. 24 Stunden nach einer einmaligen subcutanen Benzolinjektion aufgearbeitet. Im Knochenmark aller Tiere fanden sich vermehrt Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen. Eine Ausnahme bildeten Ratten, die 36 Stunden nach einer einmaligen subcutanen Benzolapplikation getötet wurden. Die Knochenmarksuntersuchung zeigte hier kein vergleichbares Ergebnis.

LYON (1975) untersuchte den mutagenen Effekt von Benzol an Ratten nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 0,5 ml/kg Körpergewicht. Ein Dominanter-Letal-Versuch brachte negative Ergebnisse. Die zytogenetische Analyse des Knochenmarks 1, 8, 30 und 70 Tage nach der einmaligen Injektion zeigten einen signifikant erhöhten Prozentsatz aberranter Metaphasen.

RÖHRBORN und BASLER (1977) untersuchten Oozyten von NMRI-Mäusen, die nach intraperitonealer Injektion von 0,5 ml Benzol/kg KG nach der Methode von RÖHRBORN und HANSMANN (1971) präpariert wurden und fanden an den Metaphase-II-Chromosomen häufiger strukturelle Aberrationen als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Dieses Ergebnis ließ weitere zytogenetische Untersuchungen an Keimzellen als notwendig erscheinen.

So wurde in der vorliegenden Arbeit Benzol auf seine mutagene Wirkung an Spermatogonien des Chinesischen Hamsters getestet. In anderer zytogenetischen Experimenten, die in unserem Institut durchgeführt wurden (z. B. mit Cyclophosphamid) zeigte der untersuchte Tierstamm (Ch_1) seine Sensibilität gegenüber der Auflösung von Chromosomenaberrationen durch mutagene Agentien.

Diagramm 1 gibt die gefundene Rate der strukturell aberranten Metaphasen inklusive und exklusive Gaps in Abhängigkeit von der Benzoldosis wieder.

Diagramm 1:

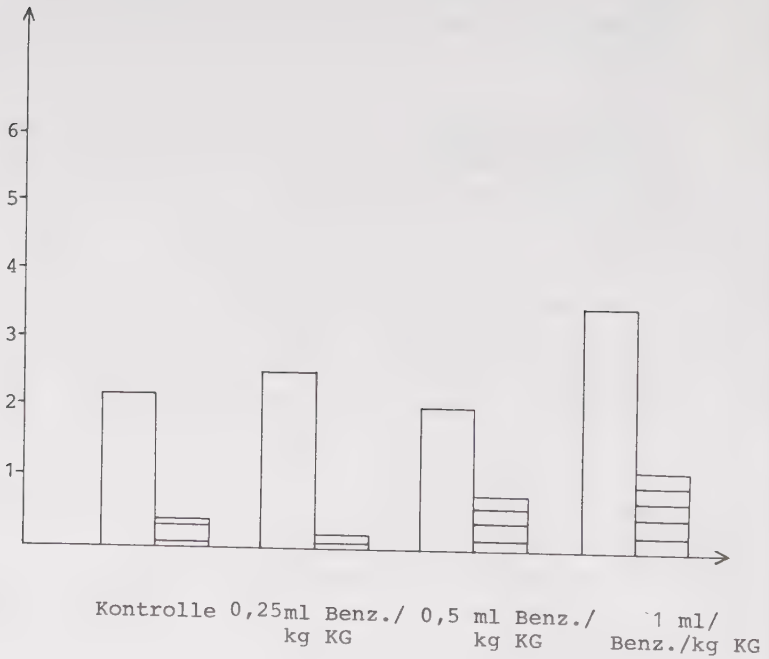


aberrante Metaphasen inklusive Gaps



aberrante Metaphasen exklusive Gaps

% aberrante
Metaphasen

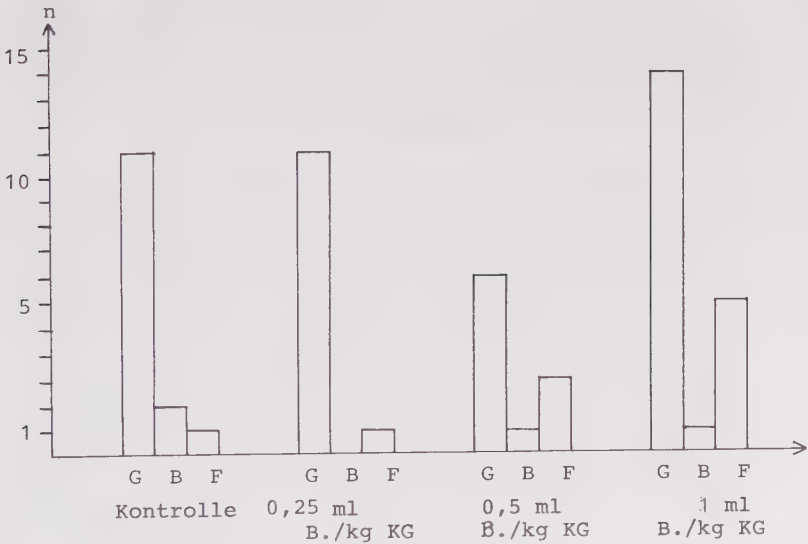


Es zeigte sich, daß Benzol in keiner der angewandten Dosierungen, weder bei Erfassung noch bei Nichterfassung der Gaps, eine signifikante Vermehrung strukturell aberranter Metaphasen verursachte.

Diagramm 2: Aberrationstypen in Abhängigkeit von der Benzoldosis

G = Gaps
B = Brüche
F = Fragmente

Aberrationen



Auch hier lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den einzelnen Benzoldosen feststellen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse stimmen mit denen überein, die RUPPERT (1977) durch Knochenmarksuntersuchungen an Versuchstieren der gleichen Spezies erzielte, scheinen jedoch im Widerspruch zu den anderen zytogenetischen Tierexperimenten mit Benzol zu stehen, die von positiven Befunden an Versuchstieren anderer Spezies berichten. Unterzieht man diese Befunde einer kritischen Überprüfung, so finden sich einige Auffälligkeiten, die eine eindeutige Wertung schwierig erscheinen lassen.

So fanden PHILIP und JENSEN (1970) zwar in 4 von 5 behandelten Gruppen von Ratten eine signifikant erhöhte Anzahl Metaphasen, die strukturelle Aberrationen zeigten, doch bestanden diese Aberrationen ausschließlich aus Chromatidenbrüchen. Andere Aberrationstypen, auch Gaps, fehlten auffälligerweise völlig.

Bei den Befunden von KISSLING und SPECK (1971) an 16 behandelten Kaninchen, bei denen pro Tier 100 Metaphasen ausgewertet wurden, zeigten sich durchschnittlich 47,5 % aberrante Metaphasen, in denen ausschließlich Gaps gefunden wurden. Insgesamt waren 57,8 % der ausgewerteten Metaphasen aberrant. Gaps stellen zwar allgemein den häufigsten Aberrationstyp dar, werden sowohl durch ionisierende Strahlen als auch durch chemische Mutagene hervorgerufen und können eine nahezu lineare Dosisabhängigkeit zeigen (EVANS, 1962, 1963; GEBHART, 1971), doch wird ihre genetische Relevanz geringer eingeschätzt als die anderer Aberrationstypen. Dies liegt besonders an den bisher nicht ausreichend vorliegenden Informationen über strukturelle Veränderungen in der Chromatide bzw. im Chromosom, die den Gaps zugrundeliegen.

Die Befunde von LYON (1975) nach zytogenetischer Analyse

des Knochenmarks von Ratten 1, 8, 30 und 70 Tage nach einer einmaligen Benzolinjektion zeigten einen signifikanten Anstieg von Zellen mit achromatischen Läsionen, Chromatidendeletionen und Chromosomendeletionen am Tag 1 und mit Chromatidendeletionen am Tag 8 der Analyse. Andere Aberrationstypen wie Gaps und Brüche konnten nicht festgestellt werden.

Eine eindeutige Wertung der Befunde sowohl von PHILIP und JENSEN (1970) als auch von KISSLING und SPECK (1971) und LYON (1975) wird zusätzlich dadurch erschwert, daß sie an Tierspezies gewonnen wurden (Ratten, Kaninchen), die sich nach übereinstimmender Meinung erfahrener Zytogenetiker nicht für zytogenetische Analysen eignen, da insbesondere nichts über die Variabilität zwischen den einzelnen Tieren bekannt ist, sodaß Zufallsbefunde nicht auszuschließen sind (RÖHRBORN, persönliche Mitteilung).

Die Befunde von RÖHRBORN und BASLER (1977) an Oozyten von mit Benzol behandelten NMRI-Mäusen zeigen sowohl eine erhöhte Rate von Gaps als auch eine signifikante Steigerung anderer Aberrationstypen wie Brüche, Fragmente, zentrische Fusionen und Interchanges. Bei dieser Oozytenmethode wirkt das zu testende Agens im Metaphase-I-Stadium auf die Zellkerne ein und somit zu einem Zeitpunkt, in dem die Chromosomen am empfindlichsten auf eventuelle Mutagene reagieren. Die Analyse erfolgt dann 13 Stunden später im Metaphase-II-Stadium. Die besondere Sensibilität dieser Untersuchungsmethode konnte auch schon bei anderen Tests nachgewiesen werden (HANS-MANN, 1973; 1974; HANSMANN und RÖHRBORN, 1973; JAGIELLO, 1968; RÖHRBORN und HANSMANN, 1971; RÖHRBORN et al., 1971).

Es stellt sich nun die Frage, ob die verschiedenen Versuchsergebnisse eine Ursache in der unterschiedlichen Empfindlichkeit der verwendeten Tierspezies gegenüber Benzol haben. Aufschlüsse darüber geben Untersuchungen von MINAI (1967), der bei verschiedenen Spezies (Kaninchen, Goldhamster, Ratte, Maus) nach fünftägiger Benzolbehandlung Körpergewicht, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl und Thymusgewicht bestimmte und mit den Ausgangswerten verglich, um so den Grad der Benzolintoxikation ersehen zu können. Dabei erwiesen sich die Ratten am empfindlichsten, wohingegen die Goldhamster die geringsten Abweichungen von der Norm zeigten. Diese Sensitivitätsabstufungen scheinen durch die unterschiedlichen zytogenetischen Befunde bestätigt zu werden.

Bei kritischer Betrachtung der bisher vorliegenden zytogenetischen Befunde (einschließlich dieser Arbeit) läßt sich kein eindeutiges Ergebnis finden.

Auf der einen Seite zeigen sich nur schwer zu bewertende positive Befunde an für zytogenetische Analysen wenig geeigneten Tierspezies (Ratte, Kaninchen) und ein positiver Befund mit der Oozytenmethode (s. o.). Auf der anderen Seite finden sich übereinstimmend negative Ergebnisse sowohl mit der Knochenmarksuntersuchung (RUPPERT) als auch in der vorliegenden Arbeit mit der Spermatogonienmethode. Beide Untersuchungen wurden an Chinesischen Hamstern durchgeführt, einer in der Zytogenetik bewährten Tierspezies.

Wenn man auch - bei Berücksichtigung dieser Ergebnisse - eine mögliche mutagene Wirkung des Benzols sehr kritisch bewerten muß, so scheinen doch weitere Untersuchungen angebracht, um ein sicheres, eindeutiges Resultat zu erzielen.

E Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Testsubstanz Benzol auf ihre mutagene Wirkung an Spermatogonien des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) untersucht. Den Versuchstieren wurde fünfmal im zeitlichen Abstand von 24 Stunden Benzol intraperitoneal appliziert. Es wurden drei verschiedene Dosierungen getestet: 1 ml/kg KG, 0,5 ml/kg KG und 0,25 ml/kg KG. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 12 Stunden nach der letzten Applikation.

Als Testmethode wurde der von SCHLEIERMACHER (1967) beschriebene Spermatogonientest modifiziert.

Die Chromosomenanalyse ergab bei keiner der drei Dosierungen eine signifikant erhöhte Aberrationsrate. Eine mutagene Wirkung des Benzols ließ sich somit nicht nachweisen.

F Literaturverzeichnis

- ADLER, I.-D. Cytogenetic effect of Mitomycin C on mouse spermatogonie.
Mutation Res. 21, 19 (1973)
- AUERBACH, C.,
ROBSON, J.M. Production of mutations by
mustard oil allyl isothiocyanate.
Nature 81, 154 (1944)
- BASLER, A.,
HERBOLD, B. Mutagenese und Umwelteinflüsse.
Hippokrates 47, 123 - 141 (1976)
- BOJE, H.,
BENKEL, W.,
HEINIGER, H. J. Untersuchungen zur Leukopoese
im Knochenmark der Ratte nach
chronischer Benzolinhalation.
Blut 21, 250 - 257 (1970)
- DEAN, B. J. Genetic Toxicology of Benzene,
Toluene, Xylenes and Phenols
Mutation Res. 47, 75 - 97 (1978)
- ENGELHARDT, G. Vergleichende Untersuchungen zur
Sensibilität von Knochenmark,
Lymphozyten und Spermatogonien
des Chinesischen Hamsters gegen-
über Nitroso-Butyl-Harnstoff.
Dissertation Ruprecht-Karl-Uni-
versität Heidelberg (1975)
- EVANS, H. J. Chromosome aberration induced
by ionising radiations.
Int. Rev. Cytol. 13, 221 - 321
(1962)

- EVANS, H. J. Chromosome aberrations and target theory.
In: S. Wolff (edt.)
Radiation-induced chromosome aberrations.
New York: Columbia University Press (1963)
- EVANS, H. J.,
BRECKON, G.,
FORD, C.-E. An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes
Cyfogenetics 3, 289 - 294 (1964)
- EVANS, H. J.,
WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single dosis of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen.
II. Chromosome damage: The production of micronuclei.
Int. J. Rad. Biol. 1, 216 - 229 (1959)
- FORD, D. K.,
YERGANIAN, G. Observations on the chromosomes of Chinese Hamster cells in tissue culture.
J. Nat. Cancer Inst. 21, 393 - 425 (1958)
- FORNI, A.,
MOREO, L. Cytogenetic studies in a case of benzene-induced erythroleukaemia.
Europ. J. Cancer 3, 251 (1967)

- FORNI, A.,
MOREO, L. Chromosome studies in a case of
benzene-induced erythroleukemia.
Europ. J. Cancer 5, 459 - 463
(1969)
- FORNI, A.,
PACIFICO, E.,
LIMONTA, A. Chromosome studies in workers
exposed to benzene or toluene
or both.
Arch. Environ. Health 22, 373
(1971)
- GÄTH, J.,
THIESS, A. M. Chromosomenuntersuchungen bei
Chemiearbeitern.
Zbl. Arbeitsmed. 22, 357 (1972)
- GEBHART, E. Experimentelle Beiträge zum
Problem der lokalen Achromasien
(Gaps).
Humangenetik 13, 98 - 107 (1971)
- GERARDE, H. W. Toxicology and Biochemistry of
Aromatic Hydrocarbons.
Elsevier Monograph
Elsevier/North Holland Biomedical
Press, Amsterdam, 1960
- GILLIAVOD, N.,
LEONARD, A. Tests for mutagenic effects of
chemical in mice
I. Effects of mitomycin C on
spermatogonia
Mutation Res. 13, 274 (1971)

GONASUN, L. M.,
WITMER, C.,
KOC SIS, J. J.,
SNYDER, R.

Benzene metabolism in mouse
liver micorsomes
Toxicol. Appl. Phainacol, 26,
398 - 406 (1973)

HANSMANN, I.

Induced chromosomal aberrations
in pronuclei, 2-cell stages and
in morulae of mice.
Mutation Res. 20, 353 - 367
(1973)

HANSMANN, I.

Chromosome aberrations in
metaphase-II-oocytes. Stage
sensivity in the mouse oogenesis
to amethopterin and cyclophospha-
mide.
Mutation Res. 22, 175 - 191
(1974)

HANSMANN, I.,
RÖHRBORN, G.

Chromosome aberrations in pre-
implantation stages of mice after
treatment with triazoquinone.
Humangenetik 18, 101 - 109 (1973)

HARTWICH, G.,
SCHWANITZ, G.

Chromosomenuntersuchungen nach
chronischer Benzol-Exposition.
Dtsch. med. Wschr. 97, 45 - 49
(1972)

- HENSCHLER, D. Benzol.
In: Henschler, D. (Hrsg.):
Gesundheitsschädliche Arbeits-
stoffe.
Verlag Chemie GmbH,
Weinheim/Bergstraße, (1974)
- HOUGH, V. H.,
FREEMAN, S. Relative toxicity of commercial
benzene and a mixture of benzene,
toluene and xylene.
Fed. Prac. 3, 20 (1944)
- JAGIELLO, G. Action of phleomycin on the
meiosis of the mouse ovum.
Mutation Res. 6, 289 - 295 (1968)
- KHAN, H.,
KHAN, M. H. Cytogenetische Untersuchungen bei
chronischer Benzolexposition.
Arch. Toxikol. 31, 39 - 49
(1973)
- KISSLING, M.,
SPECK, B. Chromosome aberrations in
experimental benzene intoxication.
Helv. med. Acta 36, 59 - 66 (1971)
- LEBLOND, C. P.,
CLERMONT, Y. Spermatogenesis of Rat, Mouse,
Hamster and Guinea Pig as
revealed by the Periodic-Acid-
-Fuchsin Sulfurous Technique.
American J. of Anatomy 90, No 2
(1952)

LEBLOND, C. P.,
CLERMONT, Y.

Definition of the stages of the
cycle of the seminiferous
epithelium in the rat.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 55,
548 - 573 (1952)

LYON, J. P.

Mutagenicity studies with
benzene.
Ph. D. Thesis,
University of California (1975)

MACHEMER, L.,
LORKE, D.

Methode for testing mutagenic
effects of chemicals on
spermatogonia of the Chinese
Hamster.
Arzneim.-Forsch. 25, 12
1889 - 1896 (1975)

MINAI, M.

Difference in susceptibility of
benzene among rabbit, hamster,
rat and mouse.
Bull. Tokyo med. dent. Univ. 14,
327 - 338 (1967)

MÜLLER, D.,
DEINHARD, K.-H.,
Deperade, G.

Untersuchungen über die Kinetik
der Spermatogenese des Chinesi-
schen Hamsters.
Verh. Anat. Ges. 68, 93 - 97
(1974)

MÜLLER, H. J.

Artificial transmutation of the
gene.
Dcience 66, 84 - 87 (1927)

NATIONAL RESEARCH
COUNCIL ADVISORY
CENTRE ON TOXICOLOGY,
WASHINGTON D. C.

Health effects of benzene:
A review.

Prepared for the Environmental
Protection Agency.

Report Nr. NAS/ACT/P 829

June, 1976

NAU, C. A.,
NEAL, J.,
THORNTON, M.

C₉-C₁₂ fractions obtained from
petroleum destillates.

Arch. Environ. Health 12,
382 (1966)

NOESKE, K.,
MARTENS, H.

Histologische und histometrische
Untersuchungen am Benzol-geschä-
digten Rattenknochenmark.
Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.
355, 50 - 65 (1972)

NOMIYAMA, K.

Studies on poisoning by benzene
and its homologues, (6) Oxidation
rate of benzene and benzene
poisoning.
Med. J. Shinshu Univ. 7,
41 - 48 (1962)

NOMIYAMA, K.

Studies on poisoning by benzene
and its homologues, (7) Toxicity
of benzene metabolites to
hemopoiesis.
Ind. Health 3, 53 - 57 (1965)

OAKBERG, E. F.

A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germcell renewal.

Amer. J. of Anat. 99, 391 - 414 (1956)

OAKBERG, E. F.

A new concept of Spermatogonial Stem-Cell Renewal in the mouse and its Relationship to Genetic Effects.

Mutation Res. 11, 1 - 7 (1971)

PARKE, D. V.,
WILLIAMS, R. T.

Studies in detoxification, 54.
The metabolism of benzene,

- a) The formation of phenyl-glucuronide and phenylsulphuric acid from ^{14}C benzene,
- b) The metabolism of ^{14}C phenol.

Biochem. J. 55, 337 - 340 (1953)

PHILIP, P.,
JENSEN, M. K.

Benzene induced chromosome abnormalities in rat bone marrow cells.

Acta path. microbiol. scand.
Section A, 78, 489 - 490
(1970)

POLLINI, G.,
COLOMBI, R.

Il danno cromosomica midollare cell anaemia aplastica benzolica.
Med. Lav. 55, 244 - 255 (1964)

REICHERT, W.,
HANSMANN, I.,
RÖHRBORN, G.

Chromosome anomalies in mouse
oocytes after irradiation.
Humangenetik 28, 25 - 38
(1975)

RÖHRBORN, G.

Über die mögliche mutagene
Nebenwirkung von Arzneimitteln
beim Menschen.
Humangenetik 1, 205 - 231
(1965)

RÖHRBORN, G.

Correlation between mutagenesis
and carcinogenesis.
Transplacental carcinogenesis
168 - 174 (1973)

RÖHRBORN, G.

Methods for routine mutagenicity
screening in mammals and man.
In: Environmental Quality and
Safety, Vol. 4, Georg Thieme
Publishers, Stuttgart (1975)

RÖHRBORN, G.,
HANSMANN, I.

Induced chromosome aberrations
in unfertilized oocytes of mice.
Humangenetik 13, 184 - 198 (1971)

RÖHRBORN, G.,
KÜHN, O.,
HANSMANN, I.,
THON, K.

Induced chromosome aberrations in
early embryogenesis of mice.
Humangenetik 11, 316 - 322 (1971)

RÖHRBORN, G.,
BASLER, A.

Genetic aspects of dose-effect-relationships and their significance for the extrapolation to man.

Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR.
fbt. Math.-Nat.-Technik Nr. 9,
101 - 111 (1977)

RONDANELLI, E. G.,
GORINI, P.,
PECORARI, D.,
TROTTA, N.,
COLOMBI, R.

Effects du benzene sur la mitose erythroblastique. Investigations a la microcinematographie en contraste de phase.
Acta haemat. (Basel) 26,
282 - 302 (1961)

RUPPERT, G.

Untersuchungen der mutagenen Wirkung von Benzol am Knochenmark des Chinesischen Hamsters mit der Chromosomenanalyse und dem Mikrokerntest.
Dissertation Universität Düsseldorf, Inst. f. Humangenetik u. Anthropologie (1977)

SAVAGE; J. R. K.

Classification and relationship of induced chromosomal structural changes.
J. of Med. Genetics 12, 103 - 122
(1975)

- SCHLEIERMACHER, E. Über den Einfluß von Trenimon
und Endoxan auf die Meiose der
männlichen Maus.
Humangenetik 3, 127 - 133
(1966)
- SCHLEIERMACHER, E. Chromosomenaberrationen bei Mitosen
und Meiosen in vivo.
Arch. Toxikal. 28, 105 - 114
(1971)
- SCHLEIERMACHER, E. Effects of chemical mutagens on
spermatogonie of mammals.
I. Action of Mitanyncin C on mouse
spermatogonia.
Mutation Res. 21, 47 (1973)
- SCHLEIERMACHER, E.,
SCHROEDER, T. M.,
ADLER, I. D.,
URBA, M.,
VOGEL, F. Mutationen durch chemische Ein-
wirkung bei Säuger und Mensch.
Deutsche Med. Woschr. 92,
2343 - 2350 (1967)
- SELLYEI, M.,
KELEMEN, E. Chromosome study in a case of
granulocytic leukaemia with
"Pelgerisation" 7 years after
benzene pancytopenia.
Eur. J. Cancer 7, 83 - 85 (1971)
- SVIRBELY, J. L.,
DUNN, R. C.,
v. OETTINGEN, W. F. The chronic toxicity of moderate
concentrations of benzene and of
mixtures of benzene and its
momologues for rats and dogs.
J. industr. Hyg. 26, 37 (1944)

TOUGH, I. M.,
SMITH, P. G.,
COURT BROWN, W. M.,
HARNDEN, D. G.

Chromosome studies on workers
exposed to atmospheric benzene.
The possible influence of age.
Europ. J. Cancer 6, 49 (1970)

VOGEL, F.,
RÖHRBORN, G.

Mutationen durch chemische Ein-
wirkung bei Säuger und Mensch.
Dtsch. Med. Wsch. 92, 2315 - 2321
(1967)

VOGEL, F.,
RÖHRBORN, G.,
HANSMANN, I.

Testung von Fremdstoffen auf
Mutagenität.
Arzneim. Forsch. 24 Nr. 10
1665 - 1677 (1974)

WELSHONS, W. J.,
GIBSON, B. H.,
SCANDLYN, B. J.

Slide processing for the
examination of male mammalian
meiotic chromosomes.
Stain Technol. 37, 1 - 5
(1962)

WINSLOW, C.-E. A.

Summary of the national safety
council study of benzol
poisoning.
J. industr. Hyg. 9, 61 (1927)

YANT, W. P.,
SCHRENK, H. H.,
SAYERS, R. R.,
HORVATH, A. A.,
REINHART, W. H.

Urine sulfate determinations as
a measure of benzene exposure.
J. industr. Hyg. 18, 69 (1936)

Herrn Prof. Dr. G. RÖHRBORN danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Auch für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge möchte ich ihm herzlich danken.

Lebenslauf

geb. am 22.7.1953
in Gelsenkirchen

Vater: Friedrich W. Bertram,
Obergerichtsvollzieher

Mutter: Gisela Bertram, geb.
Schittko, Hausfrau

1960 - 1964

Besuch der Grundschule Berliner
Schule in Essen, Berliner Str. 63

1964 - 1972

Besuch der Alfred-Krupp-Schule,
städt. mathem.-naturw. Gymnasium
in Essen, Margaretenstr. 40

1972

Reifeprüfung

WS 1972/73

Beginn des Studiums der Zahnheil-
kunde an der Universität Düssel-
dorf

1973

Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1975

Zahnärztliche Vorprüfung

1979

Zahnärztliche Prüfung

